

1620

PATENT

MAR 03 2003

Customer No. 31561
Attorney Docket No.: 09668-US-PA

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Applicant : Chi-Ming Chen
Application No. : 10/065,610
Filed : 2002/11/4
For : NUCLEIC ACID SEQUENCING METHOD
Examiner :

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
Washington, D.C. 20231

RECEIVED

MAR 04 2003

TECH CENTER 1600/2900

Dear Sirs:

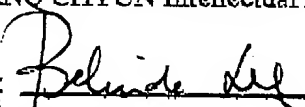
Transmitted herewith is a certified copy of Taiwan Application No.: 91118507,
filed on: 2002/8/16.

A return prepaid postcard is also included herewith.

Respectfully Submitted,
JIANQ CHYUN Intellectual Property Office

Dated: Feb. 25, 2003

By:


Belinda Lee

Registration No.: 46,863

Please send future correspondence to:
7F.-1, No. 100, Roosevelt Rd.,
Sec. 2, Taipei 100, Taiwan, R.O.C.
Tel: 886-2-2369 2800
Fax: 886-2-2369 7233 / 886-2-2369 7234

PATENT



Customer No. 31561
Attorney Docket No.: 09668-US-PA

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Applicant : Chi-Ming Chen
Application No. : 10/065,610
Filed : 2002/11/4
For : NUCLEIC ACID SEQUENCING METHOD
Examiner :

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS

Washington, D.C. 20231

RECEIVED
MAR 04 2003
TECH CENTER 1600/2900

Dear Sirs:

Transmitted herewith is a certified copy of Taiwan Application No.: 91118507,
filed on: 2002/8/16.

A return prepaid postcard is also included herewith.

Respectfully Submitted,
JIANQ CHYUN Intellectual Property Office

Dated: _____

By: _____

Belinda Lee

Registration No.: 46,863

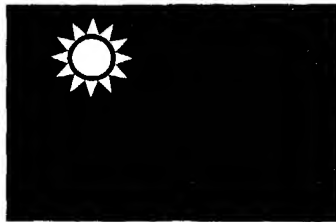
Please send future correspondence to:

7F.-1, No. 100, Roosevelt Rd.,

Sec. 2, Taipei 100, Taiwan, R.O.C.

Tel: 886-2-2369 2800

Fax: 886-2-2369 7233 / 886-2-2369 7234



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this
office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2002 年 08 月 16 日
Application Date

申請案號：091118507
Application No.

申請人：國立台灣師範大學
Applicant(s)

局長

Director General

蔡練生

發文日期：西元 2003 年 1 月 8 日
Issue Date

發文字號：09220018680
Serial No.

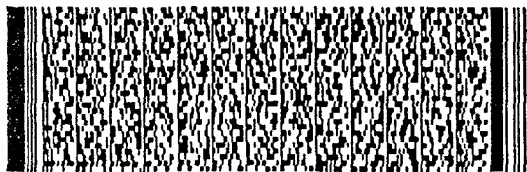
申請日期： 案號：

類別：

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中 文	核酸序列快速定序的方法
	英 文	NUCLEIC ACID SEQUENCING METHOD
二、 發明人	姓 名 (中文)	1. 陳啟明
	姓 名 (英文)	1. Chi-Ming Chen
	國 籍	1. 中華民國
	住、居所	1. 台北縣中和市景平路240巷1弄2號7樓
三、 申請人	姓 名 (名稱) (中文)	1. 國立臺灣師範大學
	姓 名 (名稱) (英文)	1. NATIONAL TAIWAN NORMAL UNIVERSITY
	國 籍	1. 中華民國
	住、居所 (事務所)	1. 台北市和平東路一段162號
	代表人 姓 名 (中文)	1. 簡茂發
	代表人 姓 名 (英文)	1. Maw-Fa CHIEN

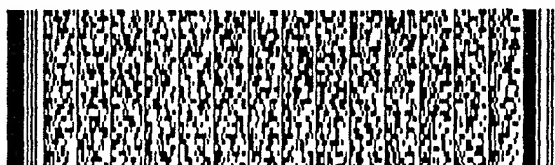
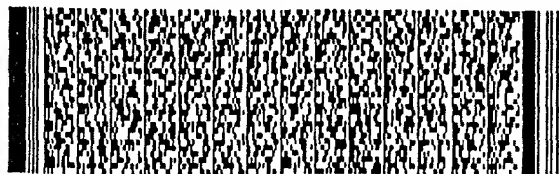


四、中文發明摘要 (發明之名稱：核酸序列快速定序的方法)

一種核酸序列快速定序的方法，此方法係利用一旋轉電場來控制一核酸序列通過一奈米小孔的時間。其中，核酸序列之每一個核酸分子通過奈米小孔的時間係為此旋轉電場之 $1/4$ 週期的整數倍。藉著比對數組由同一核酸序列通過奈米小孔的堵塞離子流時間序列，可以判別出核酸序列上各種核酸分子排列的順序，以及其接連重複出現的數目。因此，藉由調整旋轉場的頻率，便可以快速的對核酸序列作定序。

英文發明摘要 (發明之名稱：NUCLEIC ACID SEQUENCING METHOD)

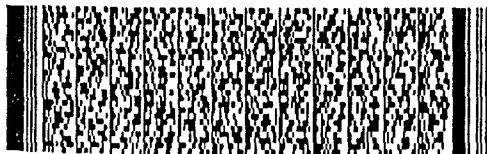
The present invention relates to a nucleic acid sequencing method by using a rotating electric field to control shifting of a polynucleotide sequence through a nanopore. The shifting time of each nucleotide passing through the nanopore is found to be multiple times of $1/4$ the period of the rotating electric field. By comparing changes of the blockage current for the polynucleotide sequence through the nanopore with time and the measuring the shift time, the linking



四、中文發明摘要 (發明之名稱：核酸序列快速定序的方法)

英文發明摘要 (發明之名稱：NUCLEIC ACID SEQUENCING METHOD)

order of the nucleotides in the polynucleotide sequence and the repeating nucleotide numbers can be determined. Therefore, a rapid nucleic acid sequencing method is provided when the rotating electric filed is adjusted with an adequate frequency.



本案已向

國(地區)申請專利

申請日期

案號

主張優先權

無

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

無

五、發明說明 (1)

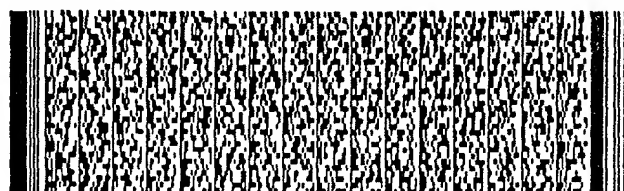
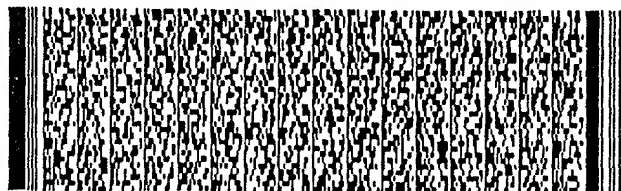
本發明是有關於一種核酸序列(Nucleic Acid Sequence)定序的方法，且特別是有關於一種利用旋轉電場(Rotating Electric Field)來對核酸序列作快速定序的方法。在本發明中，核酸序列係包括DNA(Deoxyribonucleic Acid)以及RNA(Ribonucleic Acid)。

隨著人類基因序列定序的完成，藉由基因序列來診斷疾病甚至治療疾病已是必然的趨勢。因此，目前已有許多研究往核酸序列定序的方法及其定序儀器發展。

習知一種核酸序列定序的方法係由Frederick Sanger所提出，此種方法是利用使DNA在控制之下停止複製，藉以得到一系列長短不同的片段，然後再由這些片段導出DNA的序列。其詳細之說明如下。

首先，準備聚合連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)試劑，其包括聚合酶酵素(polymerase I)、具有互補序列之特定的引子(primer)、三磷酸去氧核糖核酸(dNTP)以及緩衝液，其中dNTP上皆已標記有放射性元素或螢光分子。另外，準備dNTP之類似物(analog)，其中dNTP之類似物並無3'-氫氧基(3'-hydroxyl group)，由於這些類似物沒有3'-氫氧基可以形成下一個磷酸二酯鍵(phosphodiester bond)，因此在PCR反應中，當DNA使用到這些類似物時，便無法再繼續往下延伸變長。

之後，將四種不同dNTP之類似物分別加入四組PCR反應試劑中，作四次PCR反應而得到四群尾端終止之片段



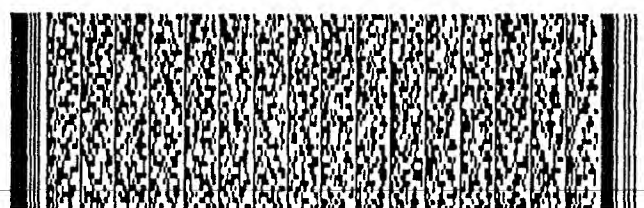
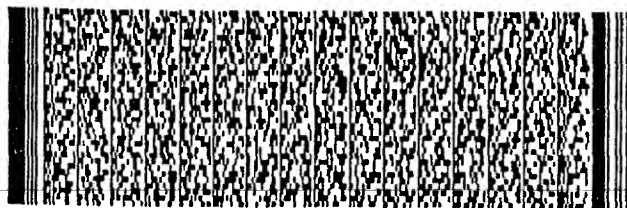
五、發明說明 (2)

(Chain Terminated Fragments)。繼之，利用電泳將每一群長短不一的DNA片段分離開來，並藉由標記在DNA片段上之螢光分子或放射性元素作偵測。最後，由所得到偵測結果而推斷出DNA的鹼基序列。

然而，習知定序之方法相當費時且昂貴，舉例如過去以傳統Sanger之定序方法進行人類基因之定序已耗費近15年以及30億美金。這是因為上述DNA定序之方法中，由於PCR反應以及電泳分析之時間都相當耗時，而且其設備以及所需之試劑的成本也相當昂貴，因此整個定序過程緩慢且昂貴。而且，對於患有急性或流行性疾病而言的病人而言，倘若無法在短時間內診斷出疾病，便無法即時進行治療而可能延誤了病情，甚至使傳染範圍擴大。因此，發展出一種快速的定序方法便有其必要性。另外，在文獻資料(L.M. Smith et al., Nature 321, 674 (1986))、(F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977))以及(For a review, see A. Marzizli, M. Aleson, Annu. Rev. Biomed. Eng. 3, 195(2001))中有提到關於習知DNA定序方法之準確度之問題，其有提到傳統DNA定序方法之準確度的確有待提升。

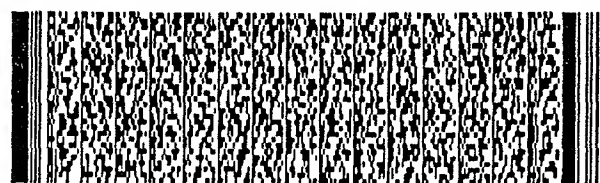
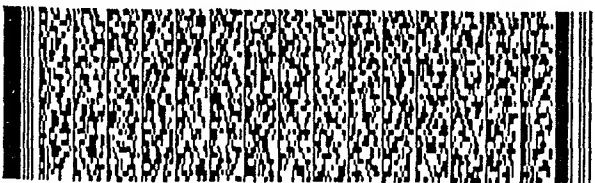
因此，本發明的目的就是提供一種核酸序列快速定序的方法，以改善習知核酸序列定序耗時且高成本之缺點。

本發明的另一目的是提供一種核酸序列快速定序的方法，以提高核酸序列定序之準確度。



五、發明說明 (3)

本發明提出一核酸序列快速定序的方法，此方法係首先提供一薄膜，其中此薄膜上已形成有一奈米小孔。接著，將一核酸序列置於薄膜上，其中此核酸序列可以是DNA或者是RNA。之後，施加垂直於薄膜之一電場，以使核酸序列能通過小孔，並且同時施加平行於薄膜之一旋轉電場，以使核酸序列在控制的速度下通過小孔。其中，形成此旋轉電場之方法係藉由兩對互相垂直之平行電極而形成，其中一對平行電極係產生具有一正弦時間變化的交流電場，而另一對平行電極係產生具有一餘弦時間變化之交流電場，當兩對交流電場具有相同之頻率，由於90度相位差交流電場的合成，便可以形成一圓形旋轉電場。特別是，此旋轉電場對核酸序列拉直或放鬆之操控，係決定於旋轉電場的頻率。對於高頻率的旋轉電場而言，由於核酸序列無法趕上電場的旋轉，因此旋轉電場並無法對核酸序列產生拉直之作用。對於低頻率的旋轉電場而言，由於核酸序列可以趕上電場的旋轉，因此旋轉電場可以對核酸序列產生拉直或放鬆之操控。而在此旋轉電場的操控下，當核酸序列被拉直的時候，核酸序列就無法穿過小孔；而當核酸序列被放鬆的時候，核酸序列才可能穿過小孔。因此，當放鬆的時間被控制得足夠小時，便可控制每次僅有一核酸分子(Nucleotide)可以通過小孔，且每一核酸分子穿過小孔的時間是核酸序列被拉直時間的整數倍。在本發明中，由於每一種核酸分子對小孔的堵塞程度不同，因此通過小孔之離子流強度也會隨著時間而變化。而此隨著時

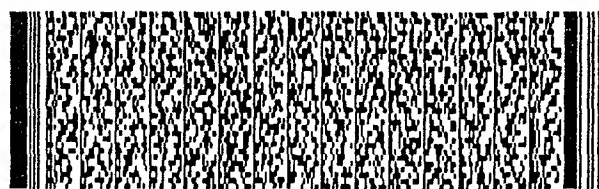
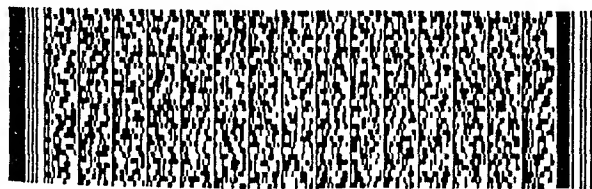


五、發明說明 (4)

間變化的離子流強度可以利用一外接的電路而記載下來。因此，藉由量測離子流隨時間的變化也可以同時反應出核酸序列之各種核酸分子的次序。除此之外，本發明還可以在核酸序列的兩端連接上兩段特定序列之片段，其除了可以用來區分核酸序列兩端之不同之外，同時還可以在測得的時間序列上標示出欲定序之核酸序列開始的位置。

本發明之核酸序列快速定序的方法可以在一薄膜上製作出一定序陣列胞室，並利用一離子束方法以在每一胞室中之薄膜上形成一小孔。藉由此種定序陣列之設計，便可以同時進行多組相同核酸序列之定序分析。比較多組相同核酸序列之定序分析所得到之離子流強度對時間的變化序列，由於每一種核酸分子堵塞小孔的時間為核酸序列被拉直時間的整數倍(旋轉電場之 $1/4$ 週期的整數倍)，因此對每一段離子流強度而言，此種核酸分子在此一段離子流對應的核酸序列所重複出現的次數，即是這些組定序分析數據的最小倍數。換言之，藉著比對數組由同一核酸序列通過奈米小孔的堵塞離子流時間序列，可以判別出核酸序列上各種核酸分子排列的順序，以及其接連重複出現的數目。因此，藉由本發明之方法便可以快速的定出核酸序列之序列，而且定序之誤差將隨著定序分析的組數增加而快速降低。

本發明之核酸序列快速定序的方法，可以快速的將核酸序列之序列定序出，以改善習知方法有過於耗時之缺點。



五、發明說明 (5)

本發明之核酸序列快速定序的方法，由於其不需利用其他特殊的試劑或酵素，因此可降低核酸序列定序的費用。

本發明之核酸序列快速定序的方法，在利用多組數據比對之後，可使準確度大幅升高。同時由本發明之方法直接對完整之核酸序列定序，因此本發明之方法較習知定序之方法準確度高。

利用本發明之方法可以設計出一方便、準確且便宜的定序儀器。

為讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉一較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

圖式之標示說明：

100：薄膜

102：小孔

104：核酸序列

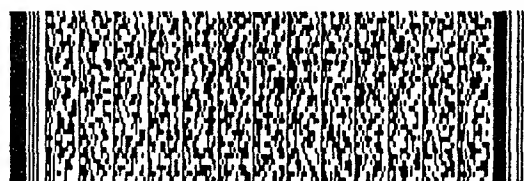
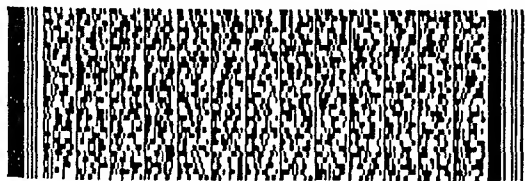
106：緩衝溶液

300：陣列胞室

實施例

第1圖所示，其繪示為依照本發明一較佳實施例之一核酸序列穿過一薄膜上之一小孔之示意圖。

請參照第1圖，首先提供一薄膜100，且薄膜100上已形成有一奈米小孔102。其中，薄膜100之材質例如是氮化矽材質，且所形成之小孔102之尺寸例如是2奈米至3奈米



五、發明說明 (6)

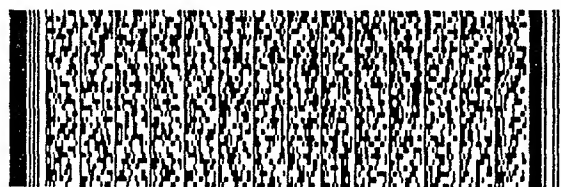
左右。而形成小孔102之方法例如是利用一離子束之方法以在薄膜100上形成小孔102。關於在薄膜100上形成小孔102之方法可參考文獻資料J. Li et al., Nature 412, 166 (2001)。

將薄膜100置於一緩衝溶液106中(如第1圖所示)，並將核酸序列104加至薄膜100上之緩衝溶液106中，其中核酸序列104可以是DNA或是RNA。由於核酸序列104係為帶負電之長鏈形分子，因此當施予一垂直於薄膜100方向之電場時，便可以驅使核酸序列104穿過薄膜100上之小孔102。

而本發明之核酸序列定序之方法除了施加一垂直於薄膜100方向之電場以使核酸序列104能穿過薄膜100上之小孔102之外，還包括施加一平行於薄膜100之旋轉電場藉以控制核酸序列104通過小孔102之速度，如第2圖所示。

在第2圖中，Z方向之電場E可驅使核酸序列104穿過薄膜100上之小孔102，而XY平面之旋轉電場 E_c 則可以操控核酸序列104被拉直或放鬆，以使核酸序列104在控制的條件下通過小孔102。

在本實施例中，旋轉電場 E_c 可以藉由兩對互相垂直之平行電極而形成，其中一對電極係生成具有正弦時間變化的交流電場，而另一對電極則是生成具有餘弦時間變化的交流電場。當兩對電極上所形成之交流電場具有相同頻率，由於90度相位差交流電場的合成，便可以形成一圓形的旋轉電場。如第2圖所示，旋轉電場 $E_c = E_c \sin(\omega$



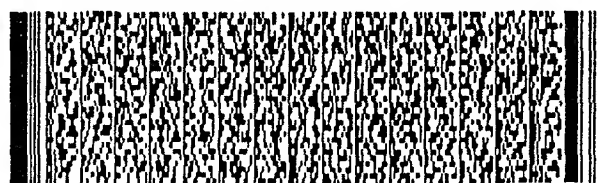
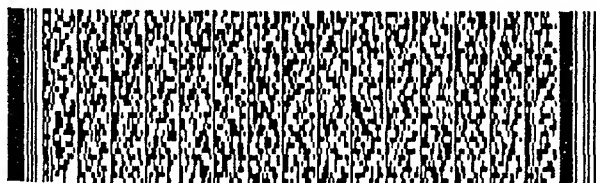
五、發明說明 (7)

$t)i + E_c \cos(\omega t)j$ ，其中 i 與 j 分別是X-方向與Y-方向之單位矢量。

其中，此旋轉電場 E_c 對核酸序列104拉直或放鬆之操控，係取決於旋轉電場 E_c 的頻率 ω 。對於高頻率的旋轉電場而言，由於核酸序列104無法趕上電場的旋轉，因此旋轉電場並無法對核酸序列104產生拉直之作用。相反的，對於低頻率的旋轉電場而言，由於核酸序列104可以趕上電場的旋轉，因此旋轉電場可以對核酸序列104產生拉直或放鬆之操控。而在旋轉電場 E_c 的操控下，當核酸序列104被拉直的時候，位於小孔102上之核酸序列104便無法穿過小孔102，而當核酸序列104被放鬆的時候，位於小孔102上之核酸序列104才可能穿過小孔102。因此，當放鬆的時間被控制得足夠小時，便可控制每次僅有一核酸分子(nucleotide)可以通過小孔102，且每一核酸分子穿過小孔102的時間是核酸序列104被拉直時間的整數倍，意即每一核酸分子穿過小孔102的時間是旋轉電場之 $1/4$ 週期的整數倍。

第3圖與第4圖所示，其繪示為利用一電腦模擬之方式模擬一核酸序列通過薄膜上之小孔的示意圖。

請參照第3圖與第4圖，具有長度 N (具有 N 個核酸分子)的一核酸序列104係以立方晶格(Cubic Lattice)空間中之鍵震盪模型(Bond-Fluctuation Model)(如第3圖所示)或連續空間(Off Lattice)之珠子彈簧模型(Bead-Spring Model)(如第4圖所示)來模擬。在此，核酸序列104係為一



五、發明說明 (8)

單股DNA(single strand DNA, ssDNA)。在本實施例中，此核酸序列104在一固定溫度下之行為(Motion)係以Metropolis Monte-Carlo 演算法進行模擬。

在鍵震盪模型中，每一核酸分子係佔用一長度為1之立方體(晶格間距)，且所允許之聯結矢量(Bond Vector)係為 $B=P(2, 0, 0) \cup P(2, 1, 0) \cup P(2, 1, 1) \cup P(2, 2, 1) \cup P(3, 0, 0) \cup P(3, 1, 0)$ ，其中 $P(a, b, c)$ 表示所有種排列及 $\pm a$ ， $\pm b$ ， $\pm c$ 之結合。此種模擬的方法是一種實際且有效的方法，且其在許多系統中係用來研究高分子動力學。關於此種模擬之方法可以參考下列文獻資料。

C.-M. Chen, Phys. Rev. E63, 010901(2001)；

C.-M. Chen, Y.-A. Fwu, Phys. Rev. E63, 011506(2001)；

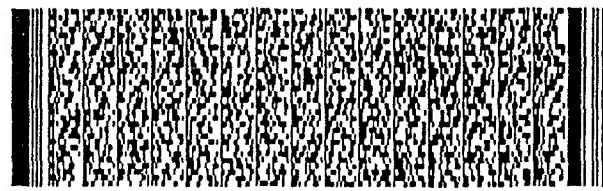
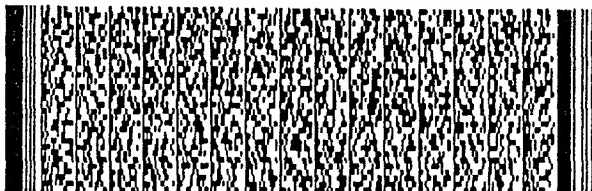
C.-M. Chen, P.G. Higgs, J Chem. Phys. 108, 4305(1998)；

I. Gerroff, A. Milchev, K. Binder, W. Paul, J. Chem. Phys. 98, 6526(1993)；

H.P. Deutsch, K. Binder, J. Chem. Phys. 94, 2294(1991)；以及

H.P. Wittmann, K. Kremer, K. Binder, J. Chem. Phys. 96, 6291(1992)。

請同時參照第2圖、第3圖與第4圖，在此模擬中，核酸序列104被施以一均勻且垂直於薄膜100之電場E(Z方向之電場)，以驅使核酸序列104能通過薄膜100上之小孔

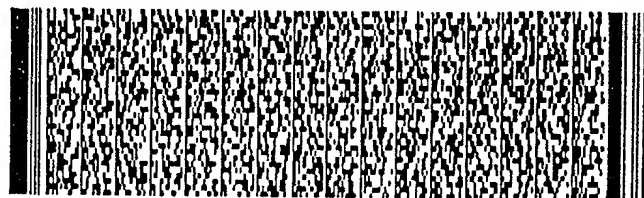
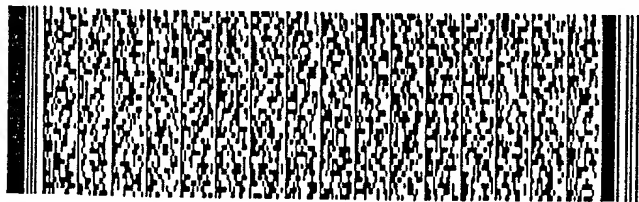


五、發明說明 (9)

102。同時，核酸序列104被施予一平行於薄膜100之旋轉電場 E_c (X-Y平面之旋轉電場)，以控制核酸序列104通過小孔102之速度。其中，此旋轉電場 E_c 之頻率以及強度可以用來控制核酸序列104上每一種核酸分子通過的速度。

在此特別說明的是，在每一時刻，隨機選出的一核酸分子在一晶格間距中會試圖向六個方向之任何之一移動。倘若核酸分子之任何移動能滿足排除體積之限制(Excluded Volume Constraint)，且新的聯結矢量仍舊在允許的狀態中時，此移動會被接受的機率 $P = \min[1, \exp(-\Delta U/kT)]$ ，其中 ΔU 係為核酸序列104的能量變化，而 kT 為熱能。在此模式中，核酸序列104之能量 $U = U_{\text{bend}} + U_{\text{electric}} + U_{\text{H-bond}}$ 。其中， $U_{\text{bend}} = \sum \langle i \rangle e(1 - \cos \theta_i)$ 係為具有堅硬值(Rigidity) e 與折彎角度(Bending Angle) $\{\theta_i\}$ 之折彎能量(Bending Energy)， U_{electric} 係為依據Z方向之一固定電場 E 以及X-Y平面之一旋轉電場 E_c 的一電位能(Electric Potential Energy)，而 $U_{\text{H-bond}}$ 係為核酸序列104之(A,T)與(C,G)鹼基對之間之氫鍵鍵能(Hydrogen Bonding Energy)。在本發明中，由於可藉由調整pH值的方式、提高溫度的方式或加入尿素(Urea)的方式而將鹼基對之間的氫鍵破壞，因此在此可忽略鹼基對之間之氫鍵鍵能 $U_{\text{H-bond}}$ 。

在此模擬中，係利用具有50個核酸分子之核酸序列104以進行通過小孔102之測試。其中，小孔102之尺寸係為3單位，溫度 T 係為1單位，均勻的電場強度 E 係為1.5單



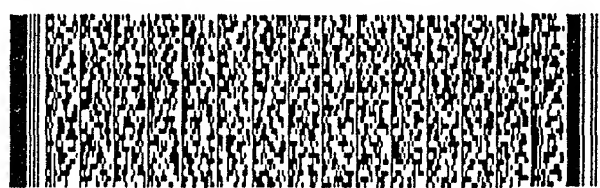
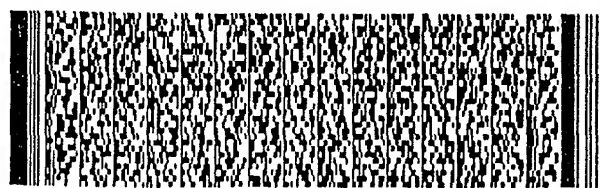
五、發明說明 (10)

位，而彎曲堅硬值 e 係為0.2單位。在此，每一核酸分子之熱能以及帶電荷量係設定為相同，且相對的電場係為107 V/m。而旋轉電場之頻率 ω 係為 10^{-1} 至 10^{-8} (MC step-1)，且旋轉電場之強度 E_c 係為0.1至1.2單位。模擬之結果如下。

第5A圖與第5B圖所示，其係為核酸序列在高頻率與低頻率旋轉電場之影響下穿過小孔的核酸分子數目與時間的關係圖。

請參照第5A圖與第5B圖，圖中之縱軸係為核酸分子通過小孔的數目(Number of Nucleotides Passed the Pore)，而橫軸係為通過小孔的時間(Time)。在第5A圖中，其係為核酸序列在高頻率($\omega \geq 10^{-3}$)之旋轉電場下非常平順的通過小孔之情形。對整個核酸序列而言，其通過小孔之時間 t_c 約為一固定值($t_c \sim 2 \times 10^4$ MC steps)。而且核酸序列中每一核酸分子之通過時間 t_n 的變化性並不大。

在第5B圖中，當核酸序列在低頻率($\omega \leq 10^{-4}$)之旋轉電場下，在第4B圖中所舉之例係為 $\omega = 10^{-6}$ ，可看見兩種通過之動力狀態。意即位於核酸序列之中間區域的核酸分子通過時間較位於核酸序列之兩端區域的核酸分子通過時間長。在頻率 $\omega = 10^{-6}$ 時，整個核酸序列之通過時間 t_c 約為108 MC steps，因此可估算出每一核酸分子在此電場下之通過時間 t_n 約為1 微秒，在模擬中之1 MC step即是 10^{-8} 秒。由此可知，所施加之旋轉電場之頻率必須低於



五、發明說明 (11)

104 赫(Hz)，才可以降低核酸序列通過小孔的速度。

第6圖所示，其係為核酸序列中各核酸分子通過小孔的時間，其在低頻率的旋轉電場影響下成量子化的現象之圖示。其中圖示橫軸上之核酸分子的排列係以其通過薄膜的時間長短由大而小排列。

請參照第6圖，圖中之縱軸係為核酸分子通過小孔之時間 t_n ，而橫軸係為核酸分子(nucleotide)。在此，旋轉電場之頻率 $\omega \leq 10^{-4}$ ，且旋轉電場 E_c 與電場 E 強度之比值 $(E_c / E) > 4$ 。此時，每一核酸分子通過小孔之時間 $t_n \sim mT_c/4$ ，其中 m 為整數，而 $T_c = 2\pi / \omega$ 。由圖中可看出，各核酸分子通過小孔的時間成量子化的現象。這是因為在晶格模擬中，當旋轉電場之方向近乎垂直於核酸序列時，薄膜上之拉力將會消失，如此便使得 t_n 有量子化之現象。值得注意的是，在第6圖中，核酸序列中之每一核酸分子的排序係以其通過時間的長短而定，而並非其在圖中之序列上的順序。

第7圖所示，其係為核酸序列通過小孔的時間與旋轉電場之頻率的關係圖。

對核酸序列在連續空間之模擬情形與其在立方晶格空間中的行為稍有不同。核酸序列在低頻的旋轉電場作用下無法完整穿過薄膜100。藉由短暫的關閉旋轉電場或調高旋轉頻率至高頻的範圍之方式(關閉或調整的時間為每 $1/4$ 週期關閉或調整 0.02 週期)，所得的結果與前述立方晶格空間的結果一致。請參照第7圖，圖中之縱軸係為核酸序

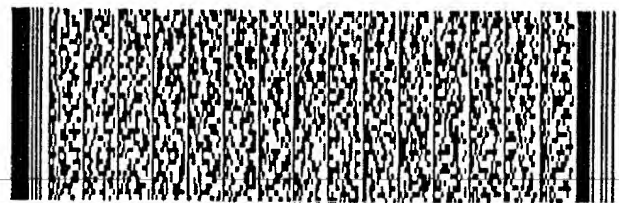
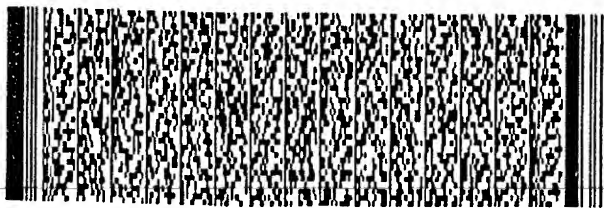


五、發明說明 (12)

列通過小孔的時間 t_c ，而橫軸係為旋轉電場之頻率(ω)。第7圖之插圖是一在連續空間模擬的典型例子，顯示一核酸序列104的核酸分子依序通過膜孔102所需的時間是 $1/4$ 旋轉電場週期的整數倍。由第7圖可知，當旋轉電場之頻率 $\omega \leq 10^{-4}$ 時，核酸序列通過小孔的時間 t_c 與旋轉電場之頻率 ω 成反比。而當旋轉電場之頻率 $\omega \geq 10^{-3}$ 時，核酸序列通過小孔的時間 t_c 幾乎成一固定值。這就表示，倘若核酸序列的反應較旋轉電場快，當核酸序列被拉直時核酸分子便無法通過小孔，而當核酸序列被放鬆時核酸分子才能通過小孔。相反的，倘若核酸序列的反應太慢，核酸序列便會非常平順的穿過小孔。換言之，上述兩種狀況的分界係依據核酸序列之反應而定。而核酸序列之反應可以藉由改變溶液之黏度或是薄膜表面之摩擦力來作調整。

值得一提的是，上述之情形對於具有30個核酸分子的核酸序列、具有70個核酸分子的核酸序列以及具有100個核酸分子的核酸序列而言，都有相同的結果。

利用本發明之方法來對核酸序列作定序更包括在核酸序列兩端(3'端及5'端)連結上兩段特殊序列之片段，用以分辨此核酸序列兩端之不同。在本實施例中，隨機的取出一段具有26個核酸分子之核酸序列，其序列係為(GTACTTCGCGTG TAGTCATTTAATCC)。而在此核酸序列之3'端係額外接上一段序列為(AAAAAAAAAAAC)之片段，在其5'端係額外接上另一段序列為(ACCCCCCCCC)之片段。由於核酸序列之前後兩端通過小孔之速度特別快而無法加以定

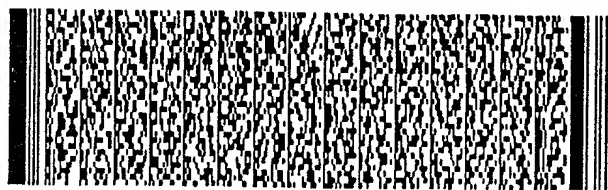


五、發明說明 (13)

序，因此在核酸序列之兩端接上特殊序列之片段除了可以用來分辨兩端之不同之外，還可以用來避免核酸序列兩端因通過小孔的速度太快而有無法定序之困擾，如第5B圖所示，核酸序列前後兩端通過小孔的速度非常快速。然而，在本發明中，由於核酸序列兩端係連接有特殊之片段，因此即使其兩端因通過速度太快而無法對兩端之序列加以定序，對欲定序核酸序列而言並不會造成影響。另外，在核酸序列兩端連接特殊之片段還具有另一優點，即可以在所測得的時間序列上標示出所欲定序的核酸序列開始的位置。

第8A圖所示，其係為一核酸序列穿過小孔的核酸分子數目與時間的關係圖；第8B圖所示，其係為對應第8A圖之核酸序列通過小孔的時間以及量測通過小孔之離子流強度的關係圖。

請參照第8A圖與第8B圖，第8A圖之縱軸係為核酸序列上之核酸分子的數目(Number of Nucleotides)，橫軸係為核酸分子通過小孔的時間(Time)，而第8B圖之縱軸係為離子流之強度(Current)，橫軸係為核酸分子通過小孔之時間(Time)。在本發明中，由於核酸序列之每一核酸分子對小孔的堵塞程度不同，因此核酸分子通過小孔之離子流強度也會隨著時間而變化。因此，本發明可以在核酸序列於通過小孔的過程中，量測通過小孔之離子流強度之變化，並利用一外接的電路，而將此隨著時間變化的離子流強度記錄下來。如此，藉由量測離子流隨時間的變化便可



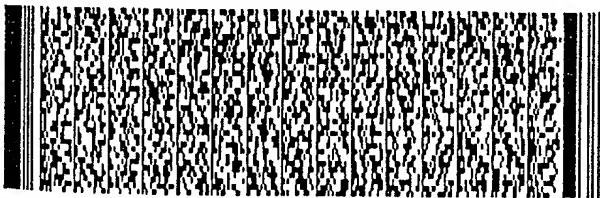
五、發明說明 (14)

以同時反應出核酸序列上各種核酸分子的次序。

第9圖所示，其繪示為依照本發明一較佳實施例之設計一定序陣列來作核酸序列之定序之示意圖。

請參照第9圖，本發明之核酸序列快速定序的方法更包括在一薄膜上製作出一定序陣列胞室300，並利用一離子束之方法以在每一胞室中之薄膜100上形成一小孔102。之後，藉由一穩定電場以及一旋轉電場以使核酸序列104在控制之下通過小孔102。並且，同時量測每一胞室中離子流之強度對時間的變化302，並利用一外接電路304而記錄下來。而藉由此種定序陣列300之設計，便可以同時進行多組相同核酸序列之定序分析。

利用上述之陣列定序之設計，以比較多組相同的核酸序列之定序分析所得到之離子流強度對時間的變化序列。由於每一核酸分子堵塞小孔的時間為拉直核酸序列時間的整數倍（每一核酸分子堵塞小孔的時間係為旋轉電場之 $1/4$ 週期的整數倍），因此對每一段離子流強度而言，此種核酸分子在此一段離子流對應的核酸序列所重複出現的次數，即是這些組數據中的最小倍數。換言之，藉著比對數組由同一核酸序列通過奈米小孔的堵塞離子流時間序列，可以判別出核酸序列上各種核酸分子排列的順序，以及其接連重複出現的數目。因此，藉由本發明之方法便可以快速的定出核酸序列之序列，而且定序之誤差將隨著組數的增加而快速降低，如第10圖所示，其係為定序誤差與定序分析比對組數之間的關係圖。



五、發明說明 (15)

請參照第10圖，圖中之縱軸係為定序之誤差(Prediction Error)，而橫軸係為定序分析比對之組數(Number of Time Series Analyzed)。當僅用一組核酸序列進行之定序分析時，其誤差約為30%。然而，隨著分析比對組數的增加，其誤差值也逐漸下降，甚至當分析比對之組數到達16組以上時，其誤差值可減至0%。

值得注意的是，由於DNA定序之準確度主要是仰賴核酸分子(A, G)或(C, T)堵塞離子流之差異。因此，本發明可以藉由一些方式而將此差異放大，例如在核酸分子之鹼基上加上一化學基，舉例如可以在A, G與C之胺基(Amino Functional Group)接上一苯基(benzoyl)。

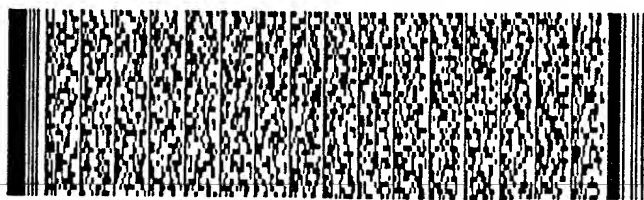
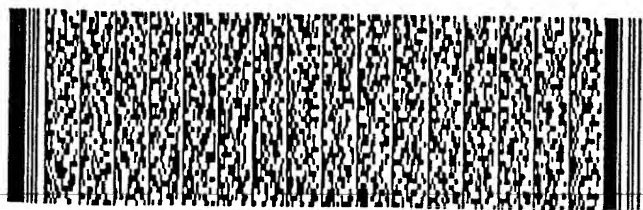
另外，在本發明之模擬中發現，施予高電場可以降低熱效應(此熱效應例如是核酸分子對抗驅動電場之反相移動)，而這種效應在低電場下將會特別明顯。然而，本發明藉由將相同的核酸序列作多組定序分析便可以消除因熱干擾(熱效應)所造成之誤差。

綜合以上所述，本發明具有下列優點：

1. 利用本發明之定序陣列，可以在1天內定出1億個鹼基序列，因此本發明可以快速的將核酸序列之序列定序出，以改善習知方法有過於耗時之缺點。

2. 本發明之核酸序列快速定序的方法，由於其不需利用其他特殊的試劑或酵素，而且可以快速的在一薄膜上製作出一定序陣列，因此可大幅降低DNA定序的費用。

3. 本發明利用定序陣列而進行多組數據之比對後，可

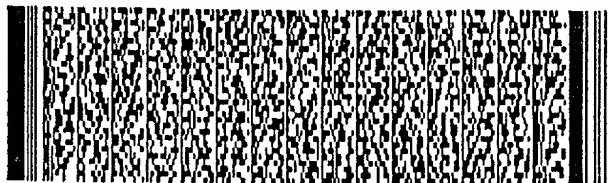


五、發明說明 (16)

使準確度大幅升高，甚至可將誤差減至0%，因此本發明之方法較習知定序之方法準確度高。

4. 利用本發明之方法可以設計出一方便、準確且便宜的定序儀器，以使其能應用於疾病診斷、醫療甚至是生化武器之檢測上。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。



圖式簡單說明

第1圖為依照本發明一較佳實施例之一核酸序列穿過一薄膜上之一小孔之示意圖；

第2圖為依照本發明一較佳實施例之一核酸序列在一旋轉電場與一穩定電場影響下，穿過薄膜上之小孔之示意圖；

第3圖為利用一電腦模擬之方式模擬一核酸序列通過薄膜上之小孔的示意圖；

第4圖為利用另一種電腦模擬之方式模擬一核酸序列通過薄膜上之小孔的示意圖；

第5A圖與第5B係為一核酸序列在高頻率與低頻率旋轉電場之影響下穿過小孔的核酸分子數目與時間的關係圖；

第6圖係為一核酸序列中各核酸分子通過小孔的時間，其在低頻率的旋轉電場影響下成量子化的現象之關係圖；

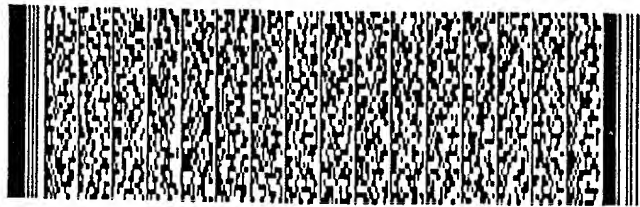
第7圖係為一核酸序列通過小孔的時間與旋轉電場之頻率的關係圖；

第8A圖為一核酸序列穿過小孔的核酸分子數目與時間的關係圖；

第8B圖為對應第8A圖之核酸序列通過小孔的時間以及量測通過小孔之離子流強度的關係圖；

第9圖為依照本發明一較佳實施例之設計一定序陣列以進行核酸序列序列之定序之示意圖；以及

第10圖為核酸序列序列之定序誤差與定序分析組數之間的關係圖。



六、申請專利範圍

1. 一種核酸序列快速定序的方法，包括：

提供一薄膜，該薄膜上已形成有一小孔；

將一核酸序列置於該薄膜上；

施予垂直於該薄膜之一電場，以使該核酸序列能通過該小孔，且同時施予平行於該薄膜之一可調變旋轉電場，以使該核酸序列在控制的速度下通過該小孔，其中該核酸序列之每一核酸分子通過該小孔的時間係為該旋轉電場之 $1/4$ 週期的整數倍；以及

藉由該核酸序列之每一核酸分子通過該小孔之時間以定出該核酸序列之序列。

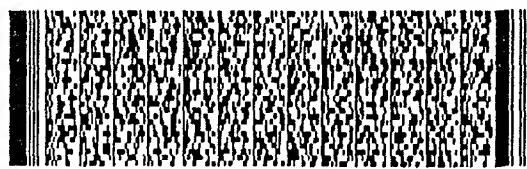
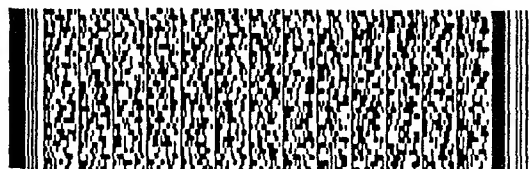
2. 如申請專利範圍第1項所述之核酸序列快速定序的方法，其中該小孔之尺寸係為2奈米至3奈米。

3. 如申請專利範圍第1項所述之核酸序列快速定序的方法，其中該薄膜包括一氮化矽薄膜。

4. 如申請專利範圍第1項所述之核酸序列快速定序的方法，其中形成該小孔之方法係利用一離子束方法以於該薄膜上形成該小孔。

5. 如申請專利範圍第1項所述之核酸序列快速定序的方法，其中形成該旋轉電場之方法係藉由兩對互相垂直之平行電極而形成，其中一對平行電極係產生具有一正弦時間變化的交流電場，而另一對平行電極係產生具有一餘弦時間變化之交流電場。

6. 如申請專利範圍第1項所述之核酸序列快速定序的方法，其中該旋轉電場之週期係小於10千赫。



六、申請專利範圍

7. 如申請專利範圍第1項所述之核酸序列快速定序的方法，其中更包括量測通過該小孔之一離子流的強度，藉由該離子流強度隨著時間的變化而定出該核酸序列之序列。

8. 如申請專利範圍第1項所述之核酸序列快速定序的方法，其中該核酸序列之兩端更包括連接上兩段特定序列之片段，藉以區分該核酸序列兩端之不同。

9. 一種核酸序列快速定序的方法，包括：

在一薄膜上形成一定序陣列胞室，其中每一胞室中具有一小孔；

將一核酸序列置於該些胞室中；

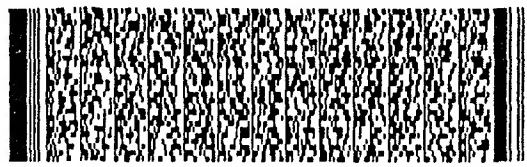
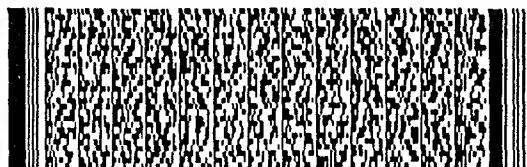
施予垂直於該薄膜之一電場，以使該核酸序列能通過該些小孔，且同時施予平行於該薄膜之一旋轉電場，以使該核酸序列在控制的速度下通過該些小孔；以及

量測通過每一該些小孔之一離子流強度，其中該離子流強度隨時間之變化係反應出該核酸序列之各種核酸分子之次序。

10. 如申請專利範圍第9項所述之核酸序列快速定序的方法，其中該小孔之尺寸係為2奈米至3奈米。

11. 如申請專利範圍第9項所述之核酸序列快速定序的方法，其中該薄膜包括一氮化矽薄膜。

12. 如申請專利範圍第9項所述之核酸序列快速定序的方法，其中形成該些小孔之方法係利用一離子束以於該薄膜上形成該些小孔。

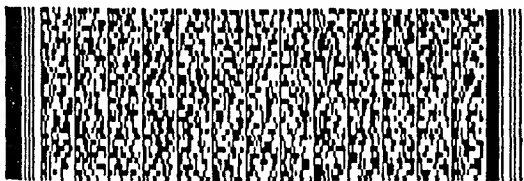


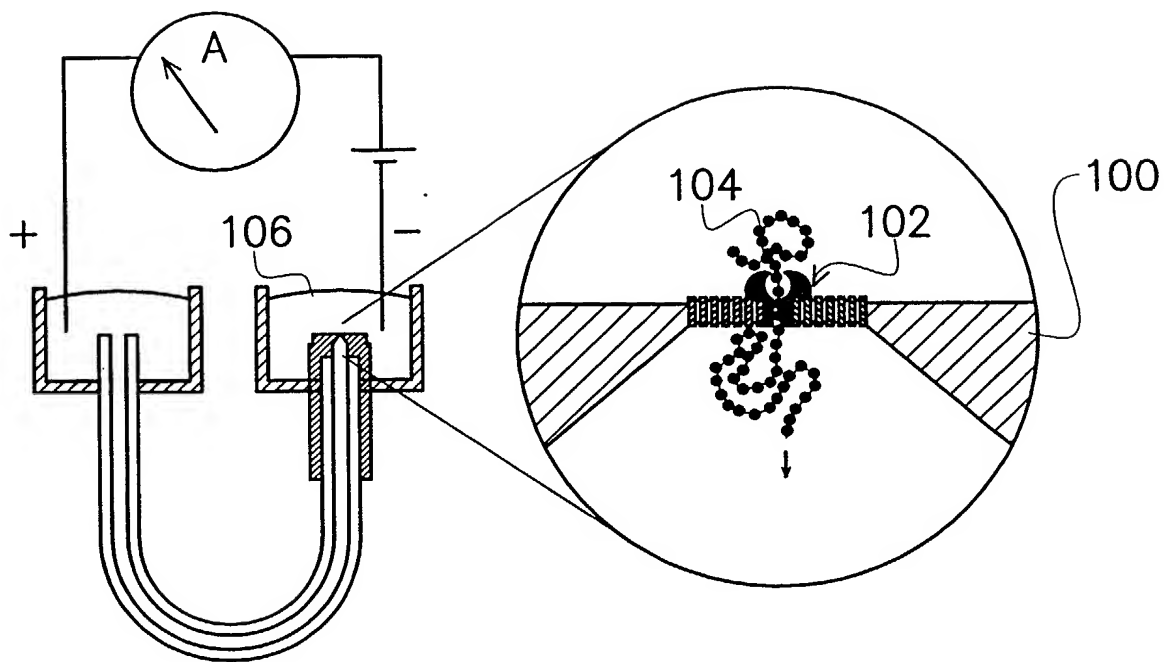
六、申請專利範圍

13. 如申請專利範圍第9項所述之核酸序列快速定序的方法，其中形成該旋轉電場之方法係藉由兩對互相垂直之平行電極而形成，其中一對平行電極係產生具有一正弦時間變化的交流電場，而另一對平行電極係產生具有一餘弦時間變化之交流電場。

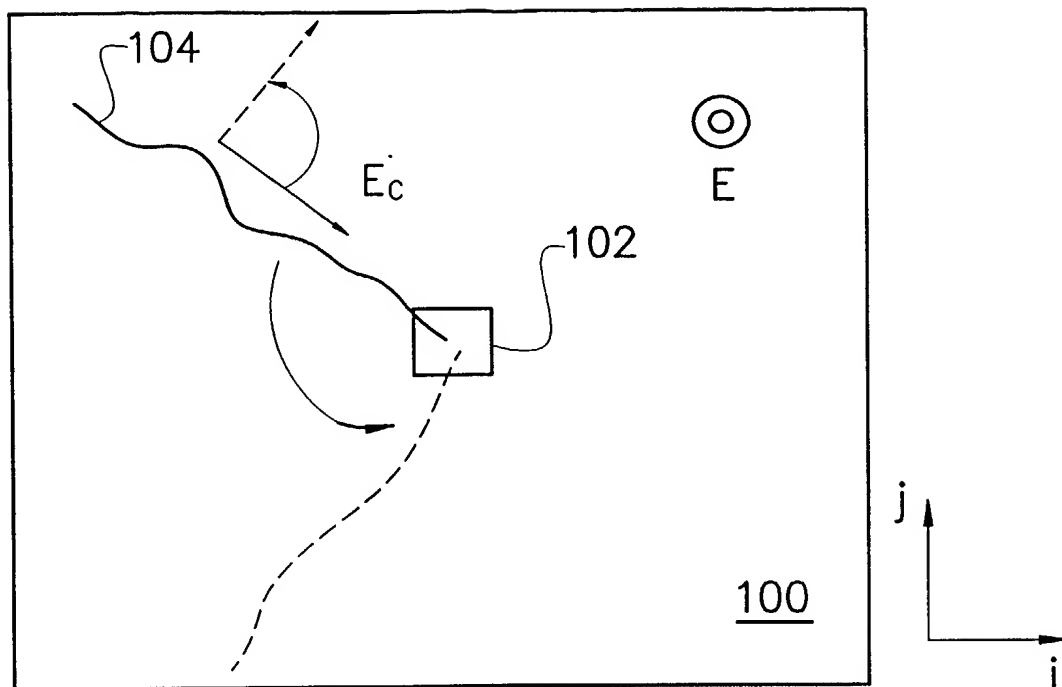
14. 如申請專利範圍第9項所述之核酸序列快速定序的方法，其中該旋轉電場之週期係小於10千赫。

15. 如申請專利範圍第9項所述之核酸序列快速定序的方法，其中該核酸序列之兩端更包括連接上兩段特定序列之片段，藉以區分該核酸序列兩端之不同。



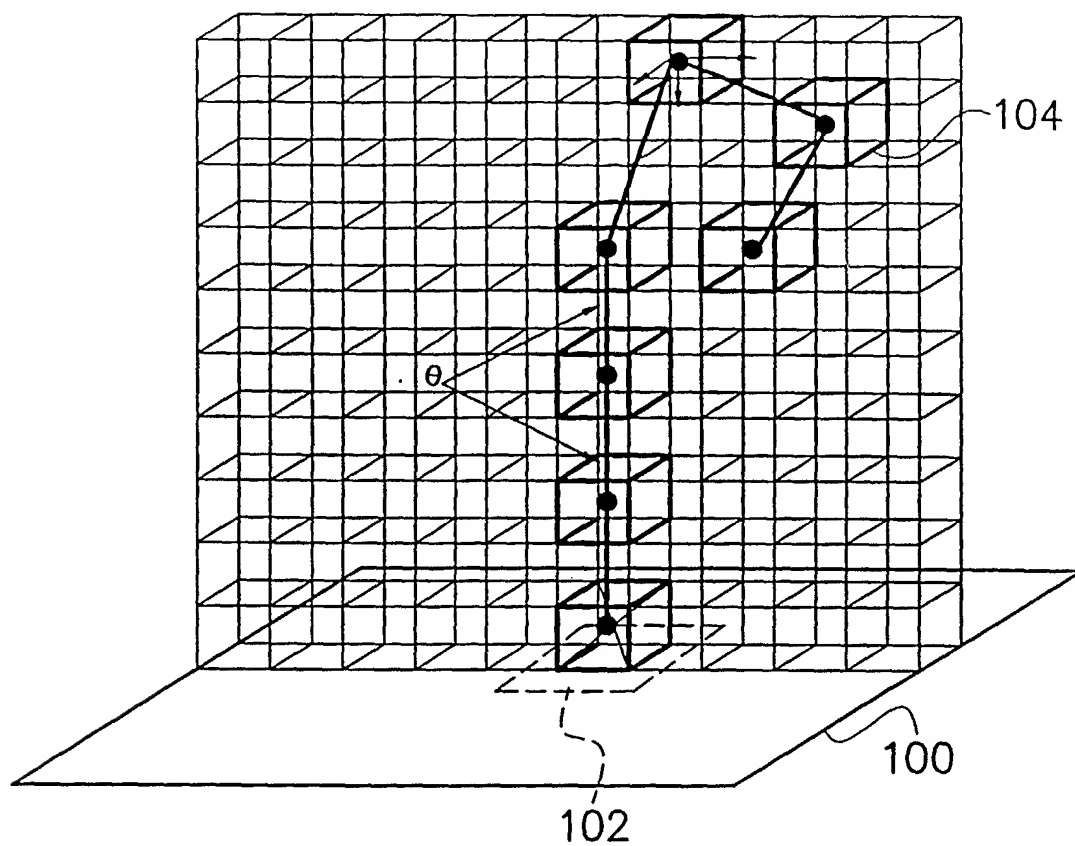


第 1 圖

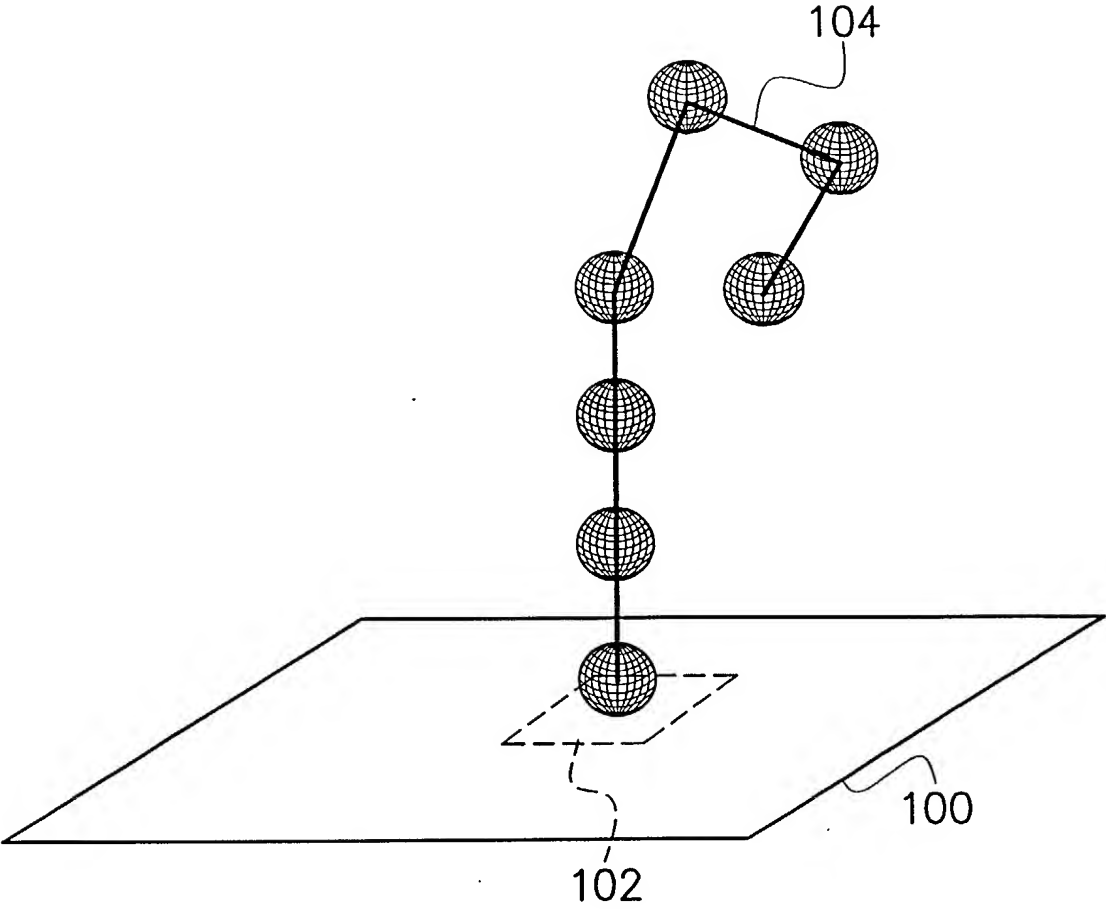


$$E_c = E_c \sin(\omega t) i + E_c \cos(\omega t) j$$

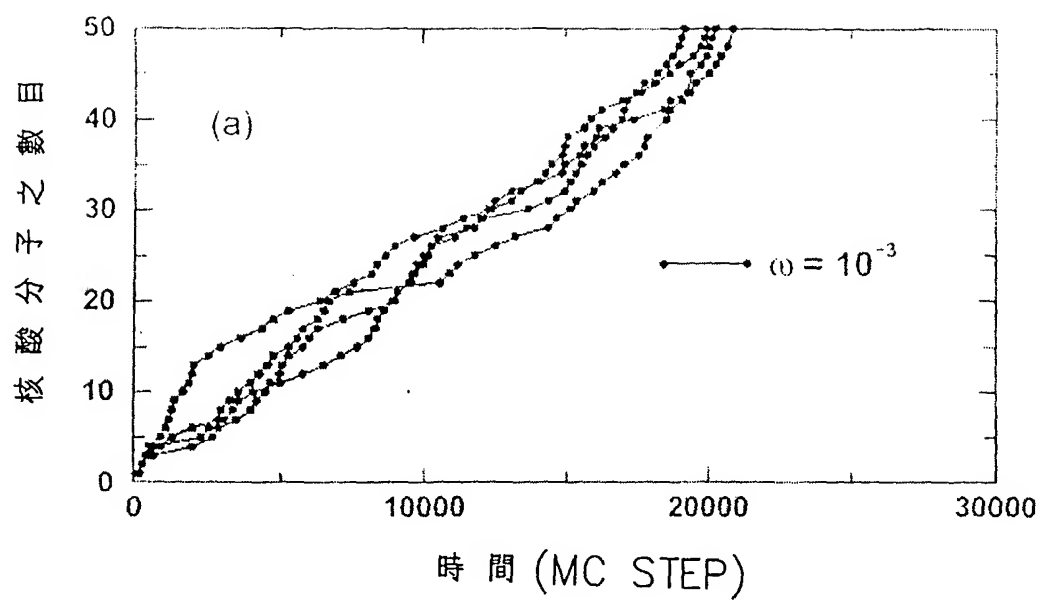
第 2 圖



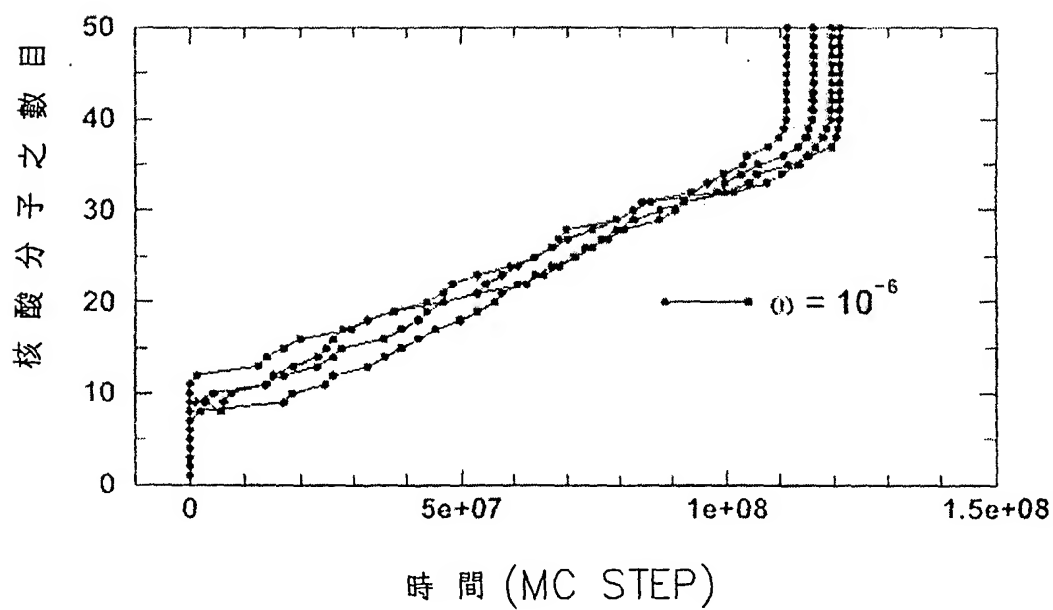
第 3 圖



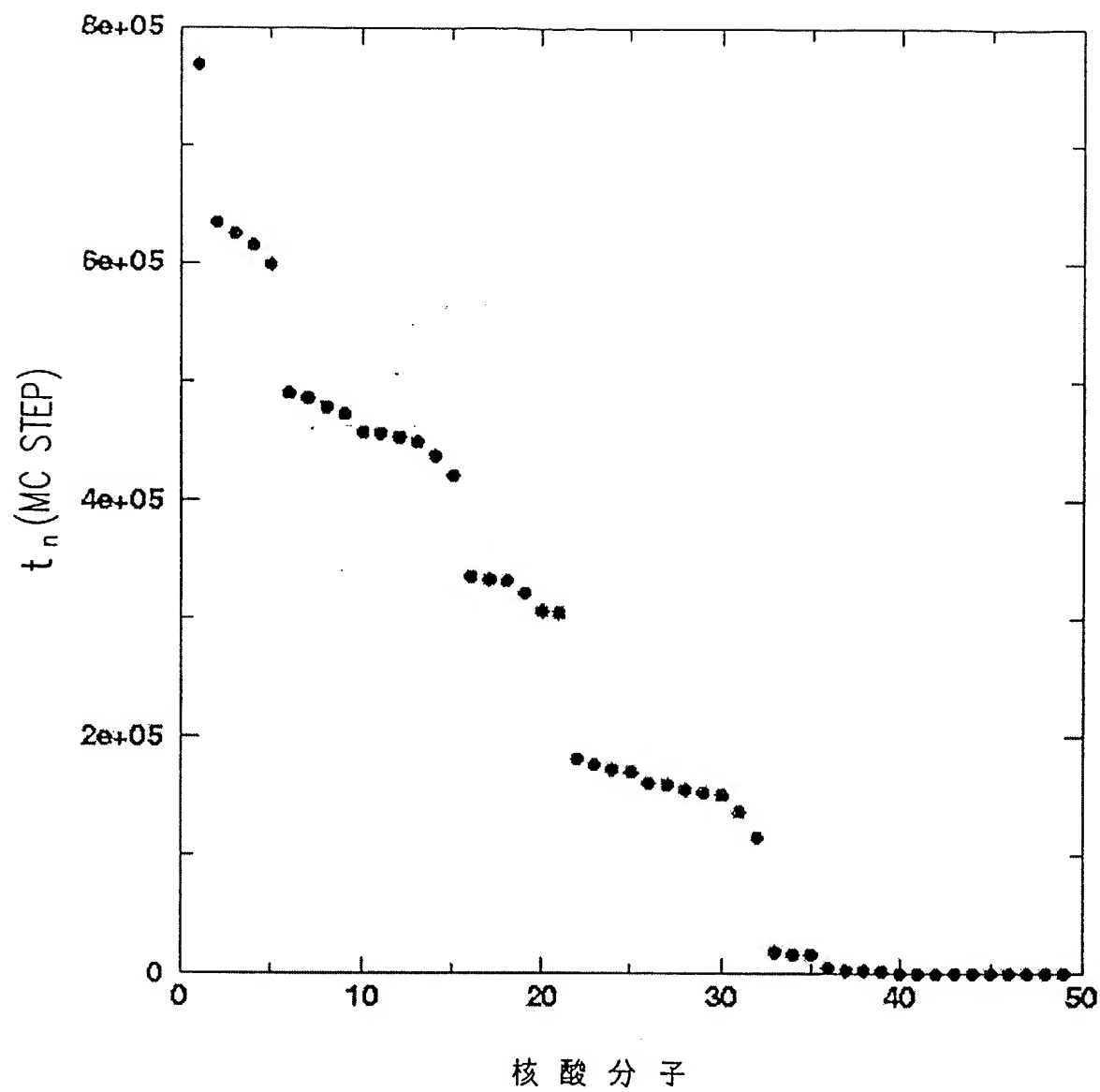
第 4 圖



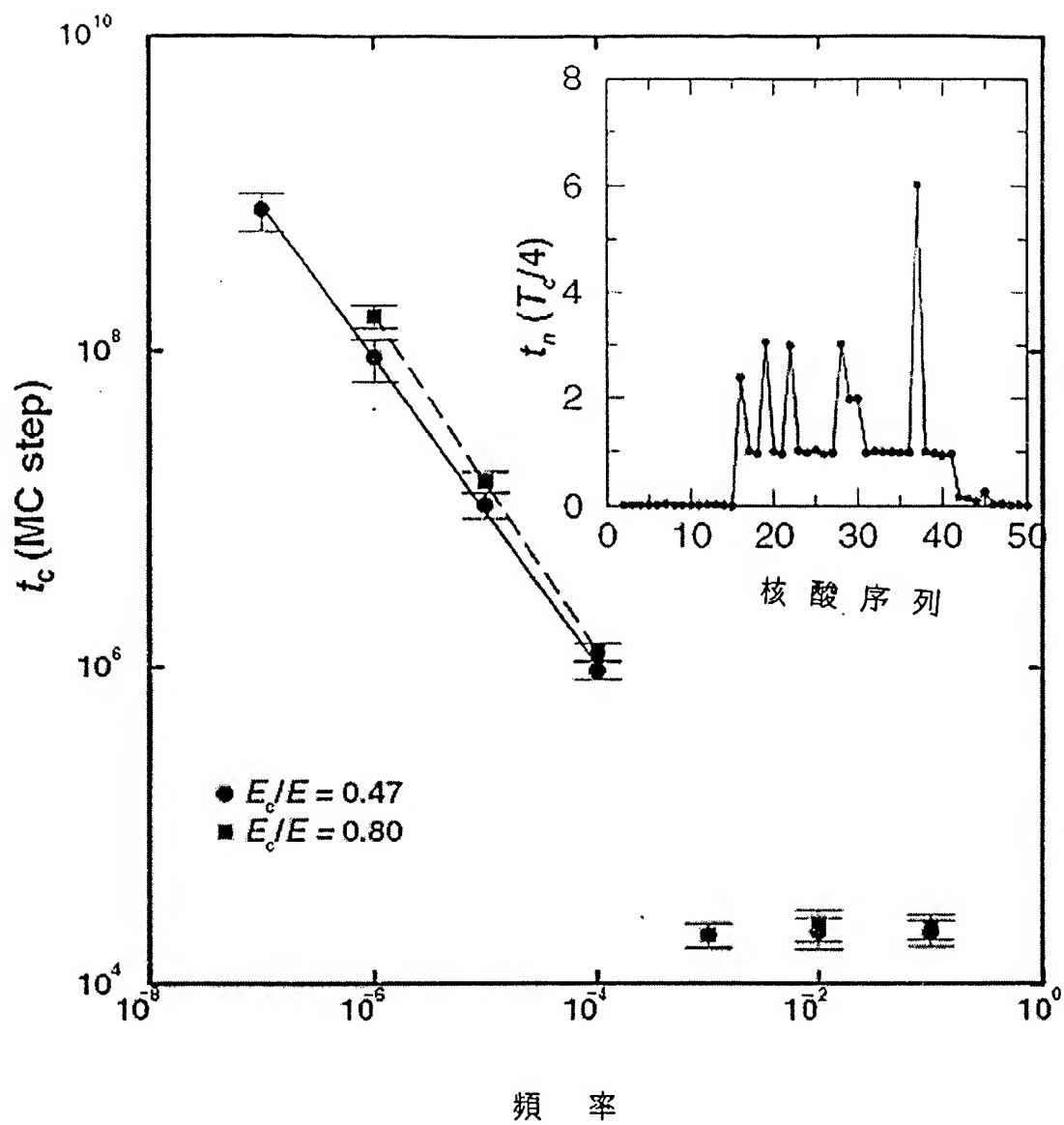
第 5A 圖



第 5B 圖

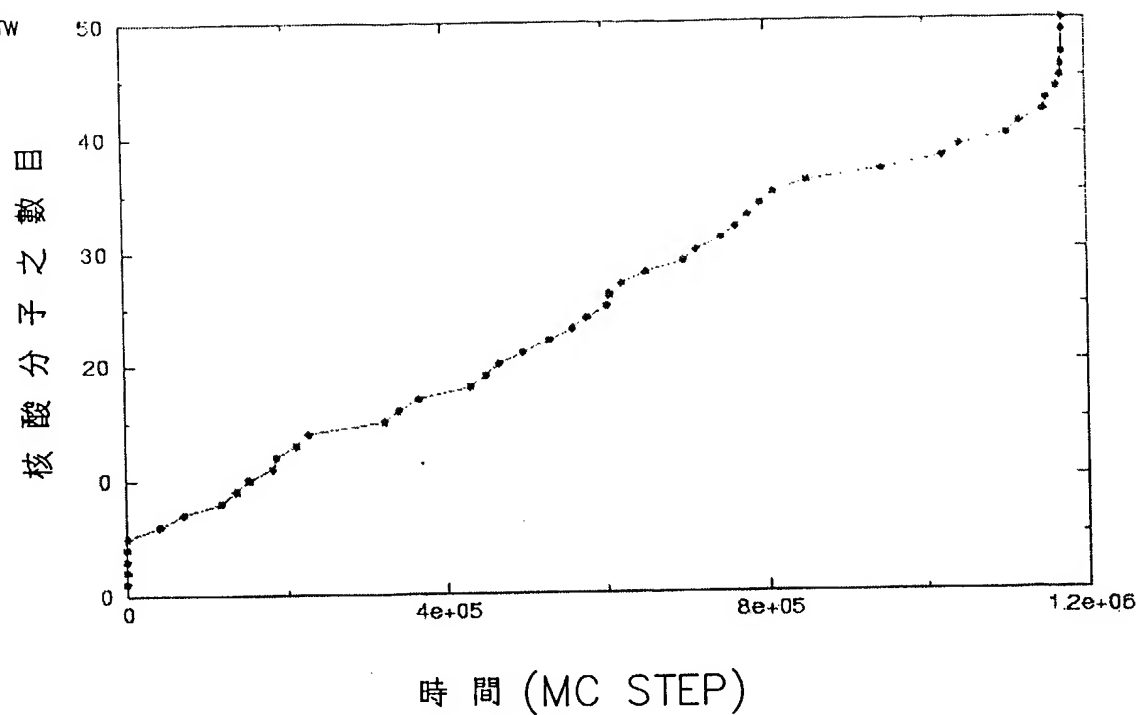


第 6 圖

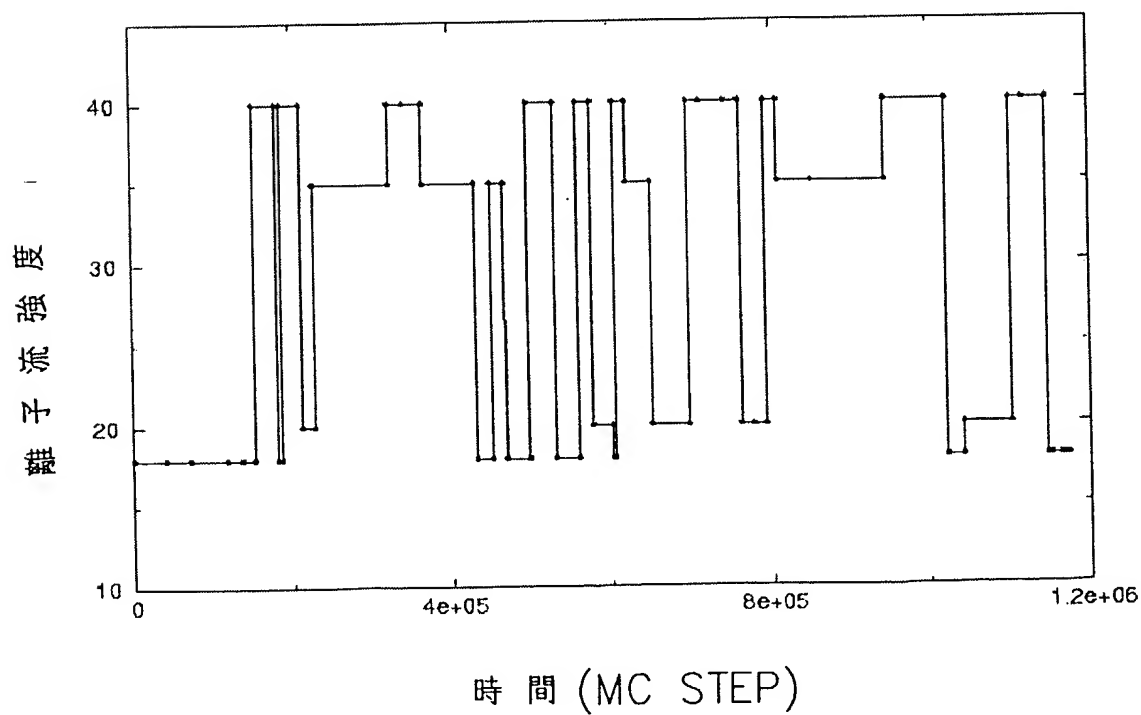


第 7 圖

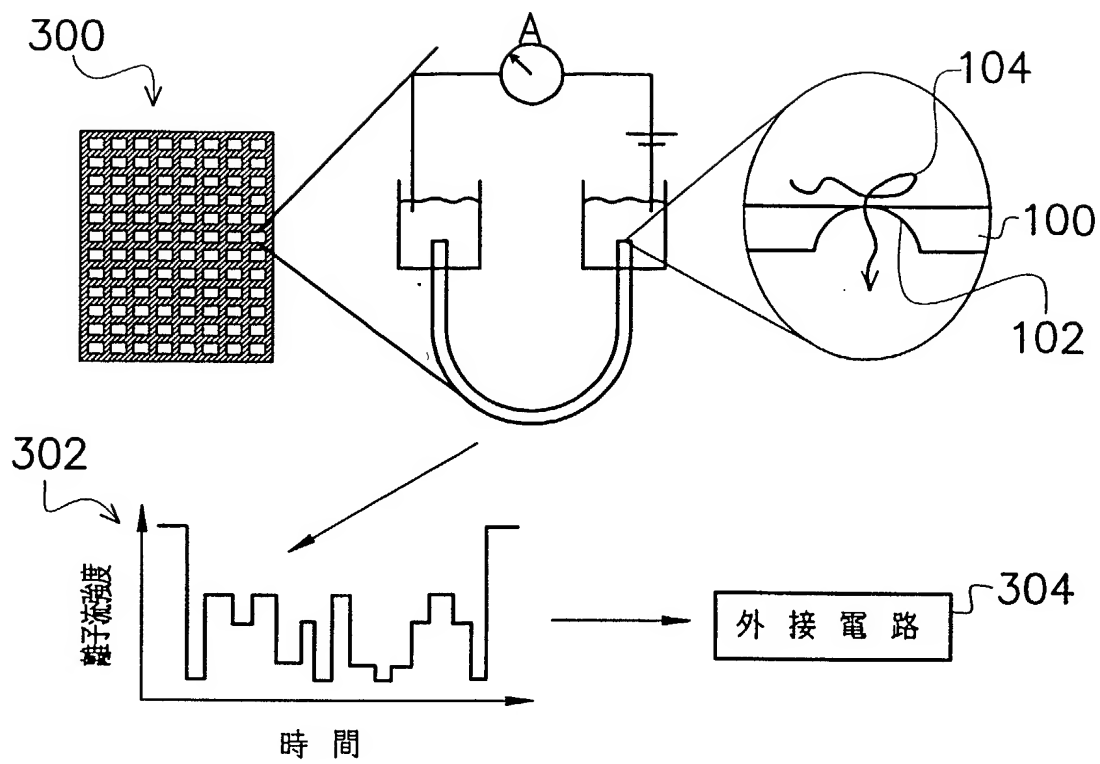
9668TW



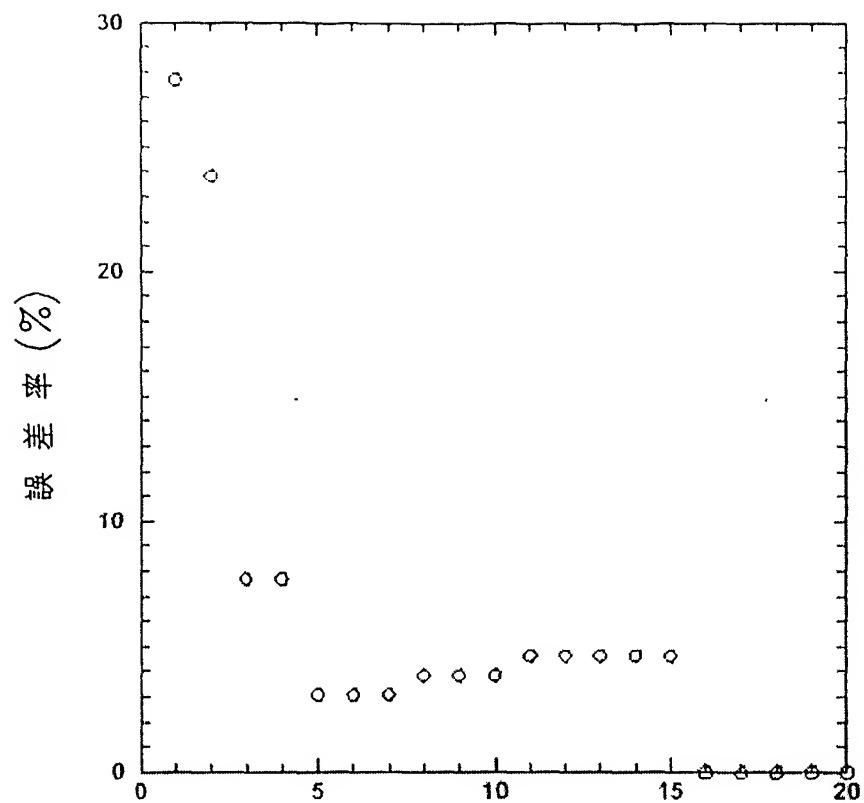
第 8A 圖



第 8B 圖



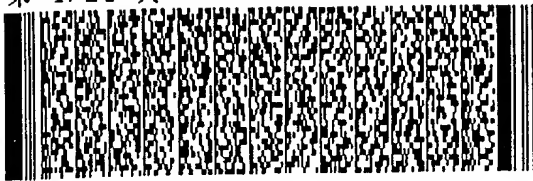
第 9 圖



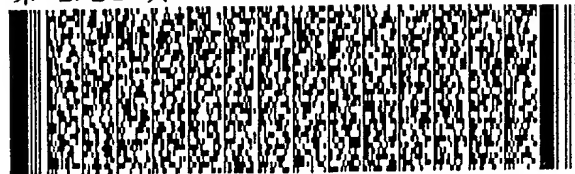
定序分析之組數

第 10 圖

第 1/24 頁



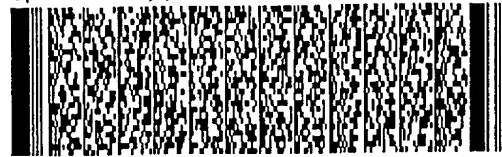
第 2/24 頁



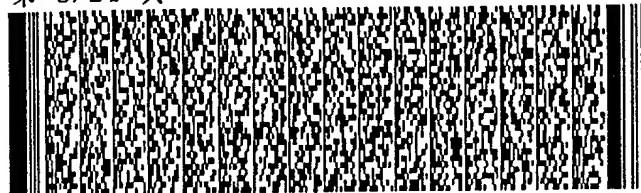
第 2/24 頁



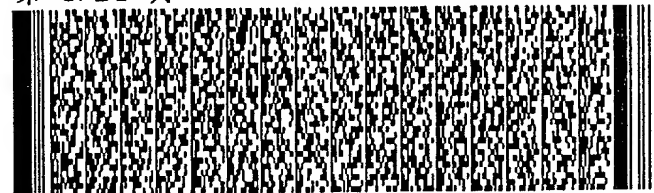
第 3/24 頁



第 5/24 頁



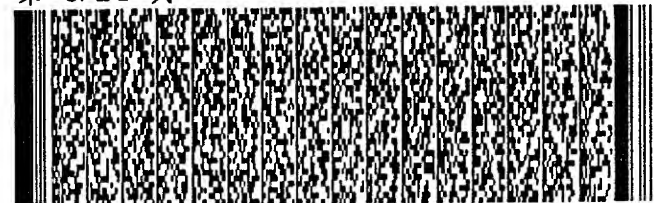
第 5/24 頁



第 6/24 頁



第 6/24 頁



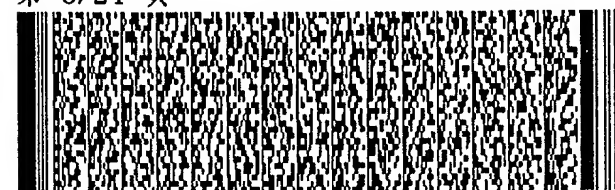
第 7/24 頁



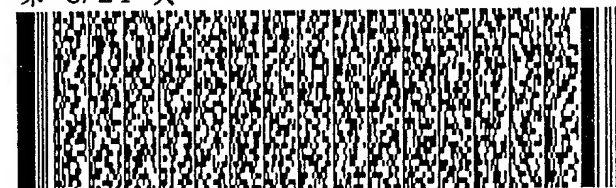
第 7/24 頁



第 8/24 頁



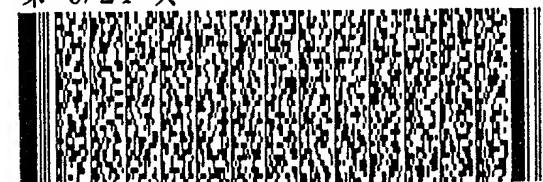
第 8/24 頁



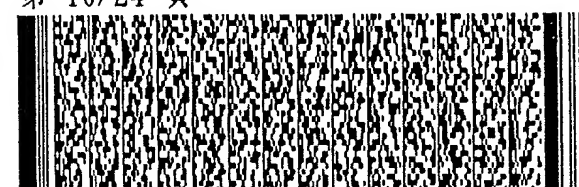
第 9/24 頁



第 9/24 頁



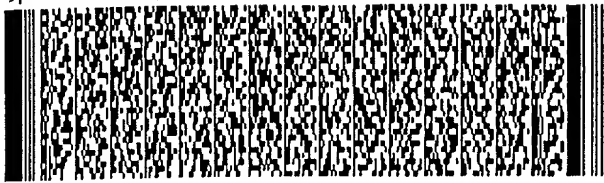
第 10/24 頁



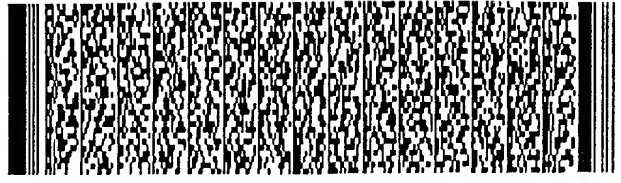
第 10/24 頁



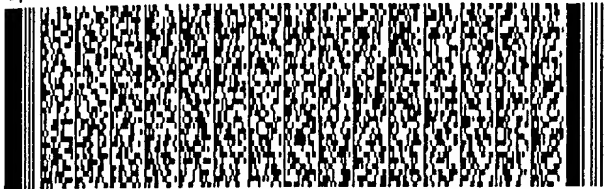
第 11/24 頁



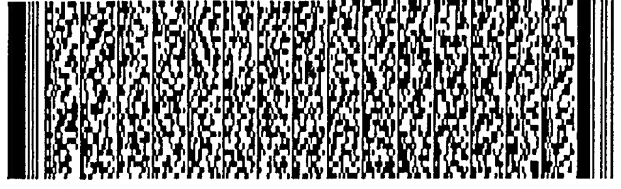
第 11/24 頁



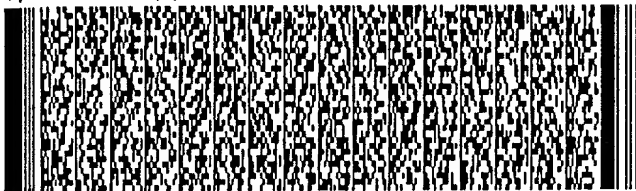
第 12/24 頁



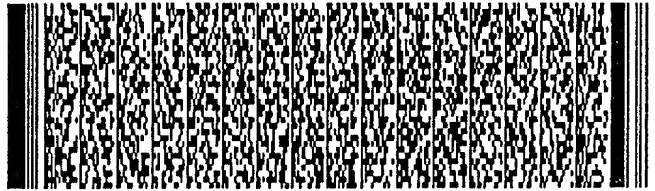
第 12/24 頁



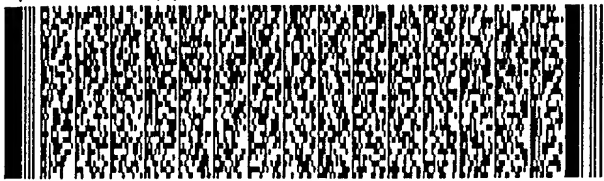
第 13/24 頁



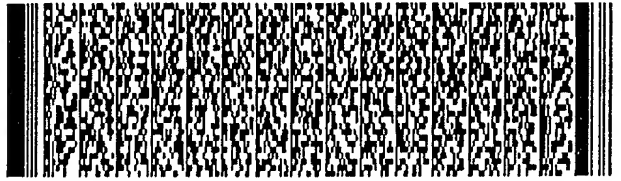
第 13/24 頁



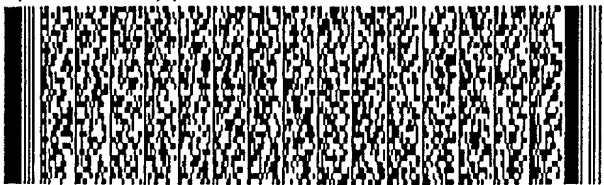
第 14/24 頁



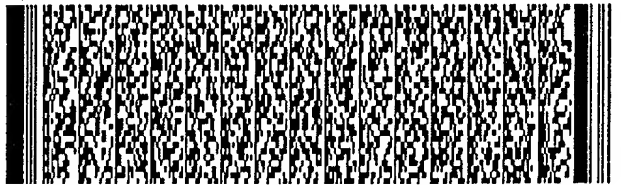
第 14/24 頁



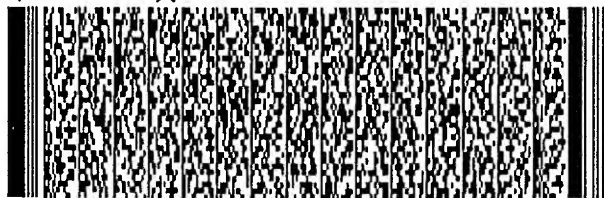
第 15/24 頁



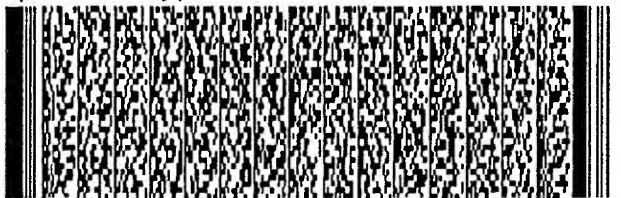
第 15/24 頁



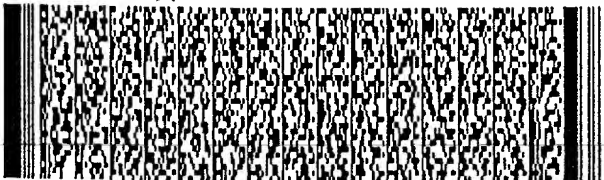
第 16/24 頁



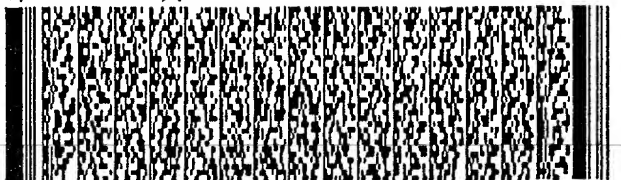
第 16/24 頁



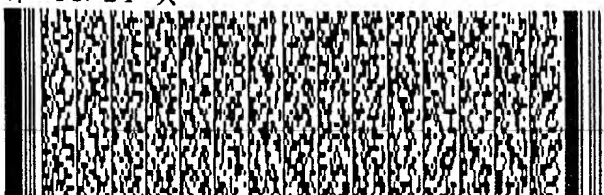
第 17/24 頁



第 17/24 頁



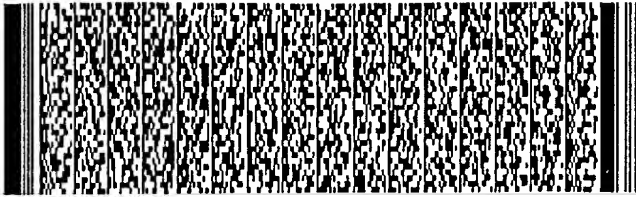
第 18/24 頁



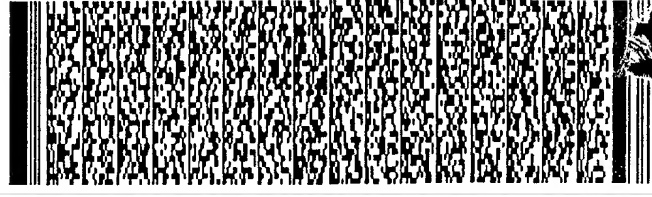
第 18/24 頁



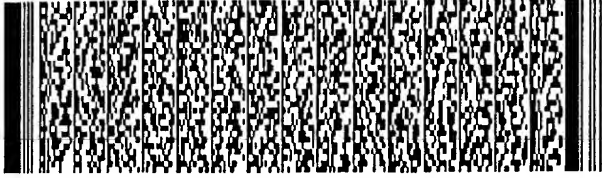
第 19/24 頁



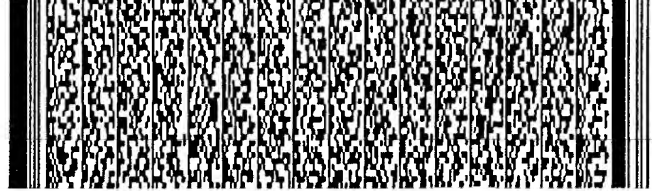
第 19/24 頁



第 20/24 頁



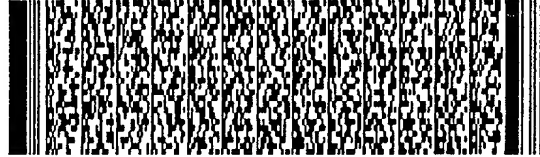
第 21/24 頁



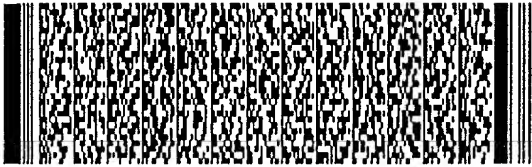
第 22/24 頁



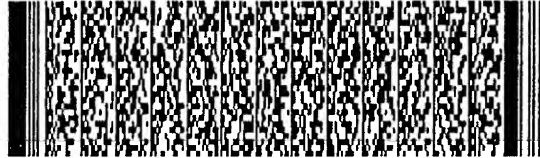
第 22/24 頁



第 23/24 頁



第 23/24 頁



第 24/24 頁

